

子囊菌 *Hirsutella rhossiliensis* 由来糖脂質の合成

大塚 功 渥美 聡孝 垣内 信子

Synthesis of New Glycosphingolipids from *Hirsutella rhossiliensis*.

Isao OHTSUKA , Toshiyuki ATSUMI , Nobuko KAKIUCHI

## Abstract

Elucidation of the function of glycolipids in natural products is very important because ecology of animals containing them is not only understood, but also their compounds will lead to development of new drugs. This research tried to synthesis of new glycosphingolipids (1, 2, and 3) that were isolated from *Hirsutella rhossiliensis*. They have neogala-series,  $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp, as core structure. Compound 1 contains also in *Neurospora crassa*, we already reported about synthesis of it. We attempted to synthesise of compounds 2 and 3.

**Key words** : Oligosaccharide synthesis, *Hirsutella rhossiliensis*, glycosphingolipid

**キーワード** : 糖鎖合成, *Hirsutella rhossiliensis*, 糖脂質

## Introduction

核酸、タンパク質と並び、生命の三大鎖と言われる糖鎖は、これまであまり研究されてこなかった。一般に4種の中性アミノ酸からなるテトラペプチド鎖に可能な1次構造は24通りに対し、4種のヘキソースからなるテトラサッカライドは34560通りにもなる。これは、糖鎖の構造の複雑さを表す一方、その潜在的な情報量はタンパク質など比べものにならないと言える。近年、多くの研究者がこの糖鎖について様々な角度から研究し、成果を挙げてきている<sup>1-3</sup>。特に細胞認識に様々な形で細胞表層の糖鎖が関与することが明らかとなり、脊椎動物、特に哺乳類における糖鎖中にシアル酸を持つ糖脂質（ガングリオシド）が、細胞の分化、増殖、癌化、接着といった生命現象に深く関与する分子種であることが証明され注目を集めている<sup>4</sup>。

これに対し、多くの無脊椎動物は、ガングリオシドを持っておらず、それとは違う珍しい構造を有している。ガングリオシドの高等動物での機能が徐々に明らかにされ

る中で、これを持たない動物種における、それに代わる糖脂質の研究が必要とされる<sup>5</sup>。しかし、これら糖脂質は生物源からの単離精製が非常に困難であり、またその結果入手できる量も極微量である。従ってこれら糖鎖の位置及び立体化学を制御した合成が可能になれば、微細に異なる種々の正確な糖鎖構造の創出が可能となり、糖鎖の関与する生命現象の解明に役立つと共に、その応用への道も期待できよう<sup>6</sup>。

谷らは、子囊菌 *Hirsutella rhossiliensis* より、三種の糖脂質を単離し、それらの構造を  $\alpha$ -D-Glcp(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ )Cer (1),  $\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ )Cer (2),  $\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ )Cer (3)と決定した (Fig 1.)<sup>7</sup>。これらは、全て  $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galp(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-Galpをコア構造に持つneogala系列に属している。また化合物1は、カビの1種である *Neurospora crassa* から単離されてきており、これまでに筆者らは1の合成を完了している<sup>8</sup>。これらの経緯より、筆者らは化合物2及び3の合成

に着手し、合成した糖脂質を生化学者に供給すべく研究を開始した (Fig 1.)。

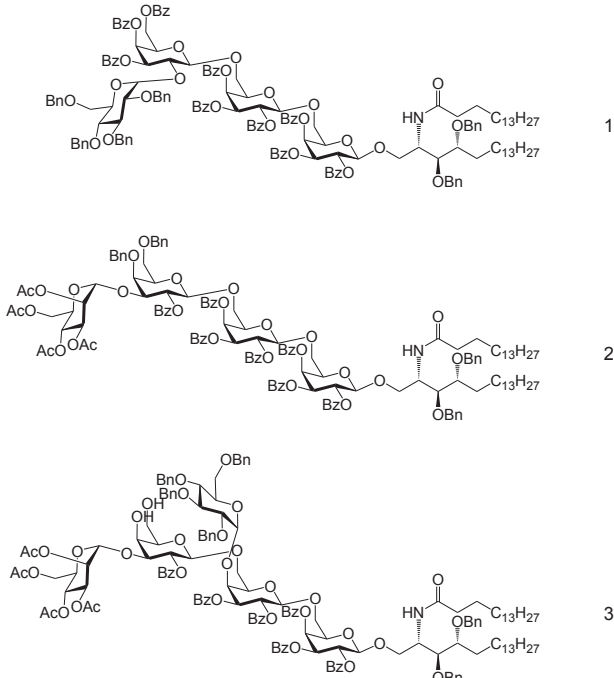
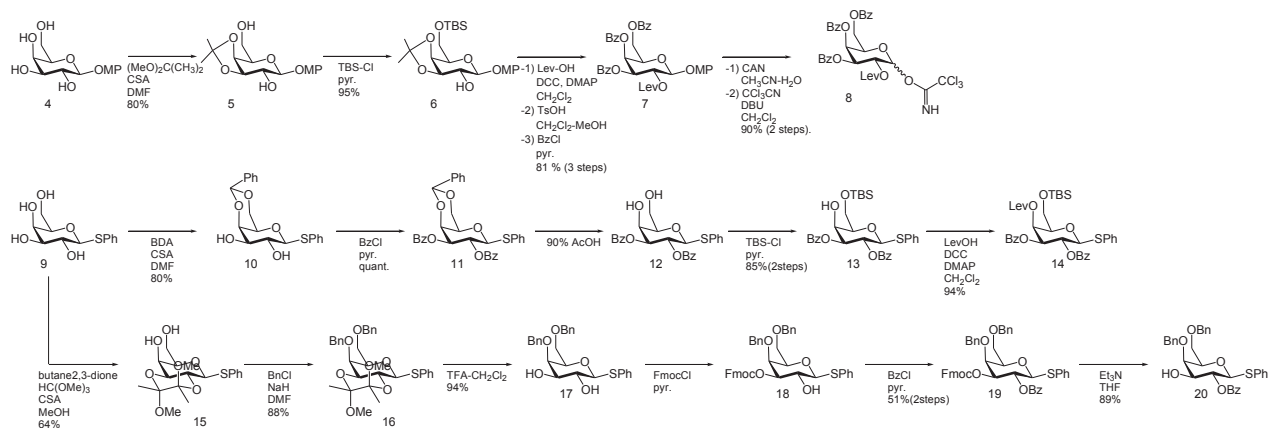


Fig 1. Structure of glycosphingolipids in *Hirsutella rhossiliensis*

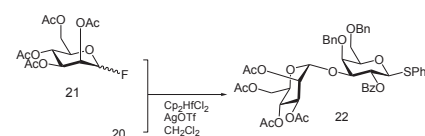
## Results and Discussions

### Synthesis of monosaccharide derivatives

ガラクトース誘導体の調製



非還元末端二糖誘導体 ( $\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp) の調製



既に化合物 1 の合成を完了していることから、2 の還元末端側二糖を有しており、これに  $\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp ユニットを縮合させることで、2 の糖鎖部分が合成される。次に化合物 3 は、還元末端から二番目のガラクトースで 3 位と 6 位に分岐していることから、この部分のガラクトース誘導体の調製が必要となる。そこで筆者らは、ガラクトース誘導体及び非還元末端側二糖である  $\alpha$ -D-Manp(1 $\rightarrow$ 3)- $\beta$ -D-Galp ユニットの合成に着手した (Fig 2.)。

### Synthesis of glycolipid 2

糖脂質 1 と共通の還元末端二糖となる 26 を 23、24 の縮合から導き、これを四糖縮合の糖受容体とした。また糖供与体に 22 を用い、NIS-TfOH の系にて縮合を行い、四糖誘導体 27 を合成した 9。27 の還元末端に位置するメトキシフェニル基 (MP) を CAN により脱保護した後 10、トリクロロアセトイミデート基に変換した 28 へと導き、糖脂質縮合の供与体とした。この 28 とセラミド誘導体を TMSOTf を活性化剤に用いて縮合を行い 11、糖脂質誘導体 29 を合成した後、ベンジル基及びベンゾイル基を脱保護することで、標的化合物である糖脂質 2 が得られた (Fig 3.) 12。

### Synthesis of glycolipid 3

糖脂質 3 は、還元末端から二番目のガラクトースのと

Fig 2. 単糖誘導体 8, 14, 20 及び二糖誘導体 22 の合成

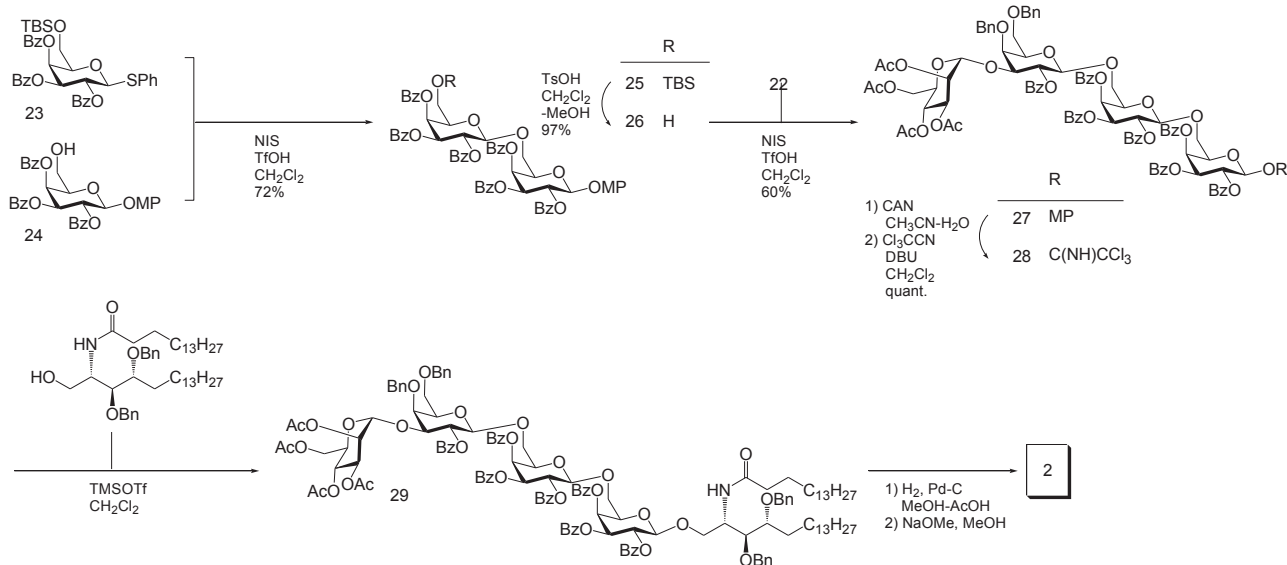


Fig 3. 糖脂質 2 の合成

ここで4位と6位に分岐していることから、其々を選択的に脱保護可能な保護基を導入した、14を二糖合成における糖供与体とし、24との縮合を試みた。NIS-TfOHの系では、TLC上に多数のスポットが観測され、目的とする二糖が得られなかった。原因として、レプリノイル基とTfOHの間で副反応が起きていることが考えられることから、NIS-AgOTfの系で縮合を行ったところ、二糖誘導体30が得られた13。合成した30にヒドラジン-酢酸14を用いることで、ガラクトース4位のレプリノイル基が選択的に脱保護された、31へと導かれ、これを三糖合成

の糖受容体とした (Fig 4)。

糖供与体32と化合物31をNIS-TfOHの系で縮合を試みた。32の2位はベンジル基で保護されていることから、隣接基関与による立体制御ができない。必要とする化合物は $\alpha$ -グリコシド体だが、 $\beta$ -体も得られると予想される。筆者らは、反応溶媒による立体効果を期待し、検討を行った。一般にグリコシル化における溶媒効果は、ニトリル系溶媒を用いると $\beta$ -体に傾き、エーテル系溶媒を用いると $\alpha$ -体に傾くことが知られている15。そこで、反応溶媒中のジエチルエーテルの比率の違いによる結合

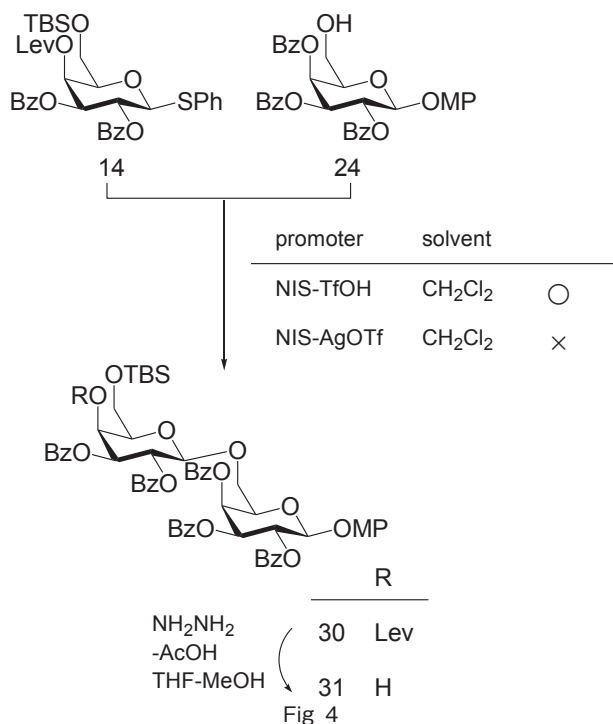


Fig 4

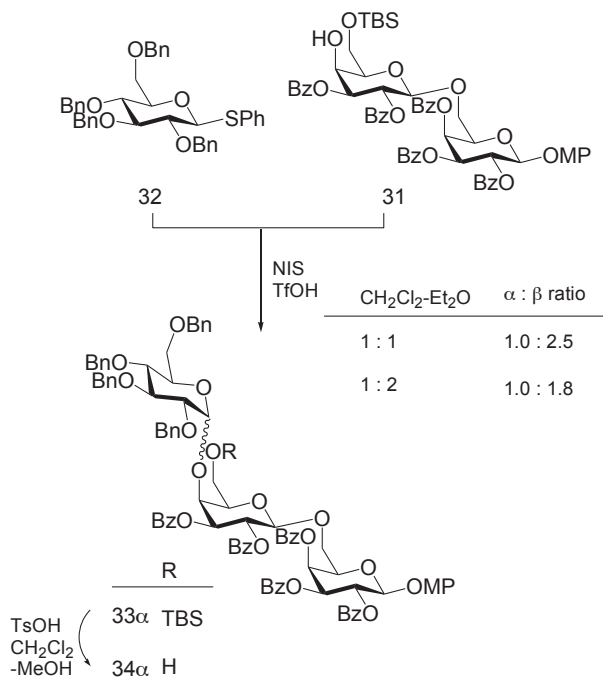


Fig 5.

様式の変化を調べたところ、 $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{Et}_2\text{O} = 1:1$ では、 $33\alpha:33\beta = 1:2.5$ であったが、 $\text{Et}_2\text{O}$ の比率を多くした $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{Et}_2\text{O} = 1:2$ 系では、 $\alpha:\beta = 1:1.8$ となり、その効果を確認した (Fig 5.)。

三糖誘導体34  $\alpha$  と二糖誘導体22をNIS-TfOHの系にて縮合を行い、五糖誘導体35を合成した。35の還元末端に位置するメトキシフェニル基 (MP) をCANにより脱保護した後、トリクロロアセトイミデート基に変換した36へと導き、糖脂質縮合の供与体とした。この36とセラミド誘導体を、TMSOTfを活性化剤に用いて縮合を行い、糖脂質誘導体37を合成した後、ベンジル基及びベンゾイル基を脱保護することで、標的化合物である糖脂質3が得られた (Fig 6.)。

### Conclusion

今回、糖脂質2及び3を合成したことで、先に合成した1と併せ、子囊菌*Hirsutella rhossiliensis* 由来新規糖脂質の合成が完了した。これら糖脂質の合成は、新たな生命現象を知ることにつながることに繋がるとともに、創薬の種にもなりうる。今後はこれら糖脂質の生理活性を明らかにし、その機能を探ってきたい。

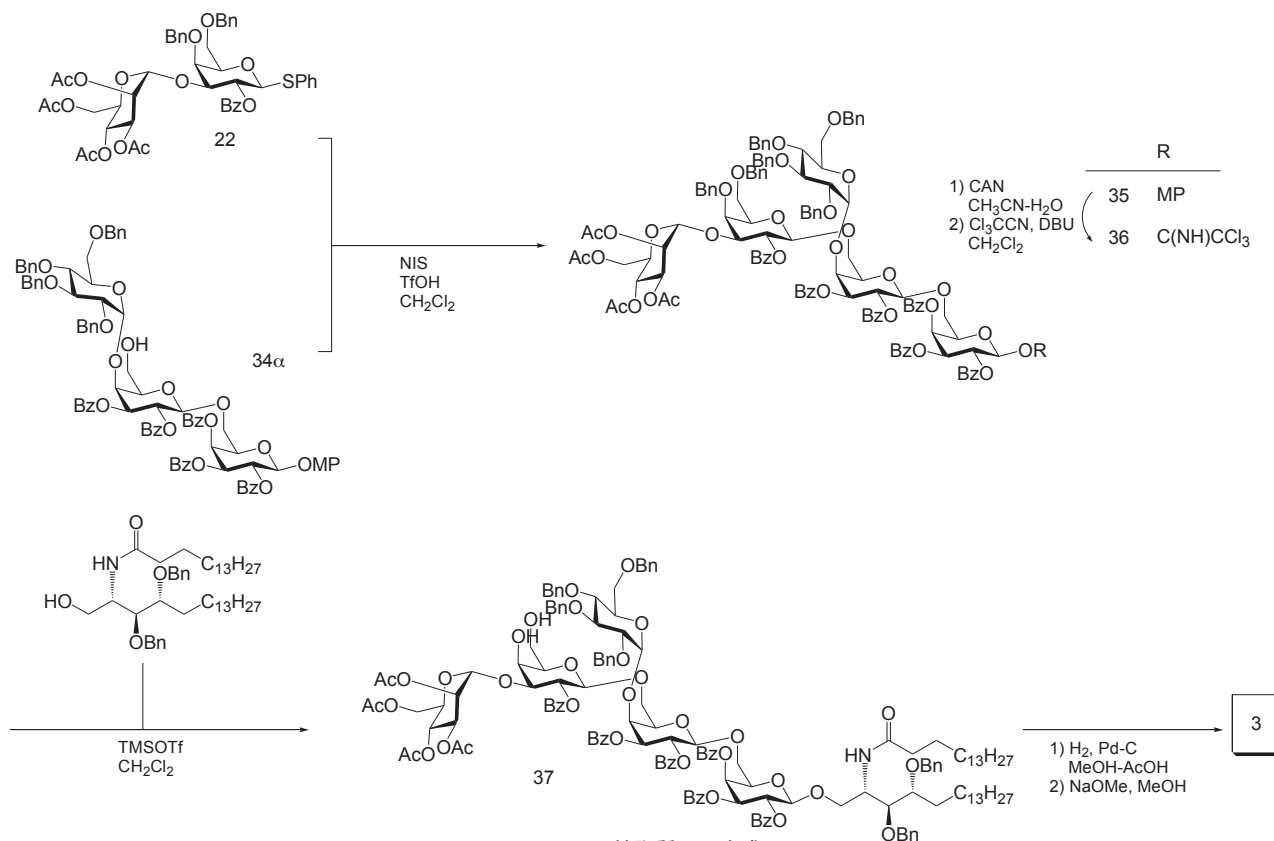


Fig 6 糖脂質3の合成

### Acknowledgements

本研究を遂行するにあたり、ご助言を賜りました、慶應義塾大学薬学部 羽田紀康准教授、国際医療福祉大学薬学部 金谷貴行助教に深謝いたします。また、本学生薬学講座の皆様には様々なご協力をいただきました。ここに深謝いたします。

### References

1. Kobata, A. Eur. J. Biochem., 209, 483 – 501 (1992).
2. Varki, A. Cell, 126, 841 – 845 (2006).
3. Angata, T.; Varki, A. Chem. Rev., 102, 439 – 469 (2002).
4. Varki, A. Glycobiology, 2, 25 – 40 (1992).
5. Itonori, S., Sugita, M. Comprehensive Glycoscience; Kamerling, J.P., Ed.; Elsevier Ltd: Amsterdam, The Netherlands, 2007, Volume 3, pp 253 – 284.
6. Hada, N., Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 18(104), 383 – 399 (2006).
7. Tani, Y., Funatsu, T., Ashida, H., Ito, M., Itonori, S., Sugita, M., Yamamoto, K., Glycobiology, 20(4), 433 – 441 (2010).

8. Ohtsuka, I., Hada, N., Atsumi, T., Kakiuchi, N., Carbohydr. Res., 404(2), 9 – 16 (2015).
9. Veeneman, G. H.; van Boom, J. H. Tetrahedron. Lett., 31(9), 1331 – 1334 (1990).
10. Schmidt, R. R.; Angew. Chem. Int. Ed., 25, 213 – 236 (1986).
11. Manabe, S., Ishi, K., Ito, Y., J. Org. Chem., 72, 6107 – 6115 (2007).
12. Demchenko, A. V. Handbook of Chemical Glycosylation; Demchenko, A. V., Ed; Wiley-VCH, Weinheim, 2008, pp 10 –11.
13. Meijer, A., Ellevik, U., J. Org. Chem., 69, 6249 – 6256 (2004).
14. Zhang, Z., Ollman, I. R., Ye, X-S., Wischnat, R., Baasov, T., Wong, C-H., J. Am. Chem. Soc., 121, 734 – 753 (1999).
15. Fügedi, P. The Organic Chemistry of Sugars; Levy, D. E.; Fügedi, P., Ed.; Taylor and Francis Group, Boca Raton, FL, 2006, pp 181 – 224.